

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE
ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS FRENTE AO
CALICÍVIRUS FELINO (FCV), ADENOVÍRUS CANINO
2 (CAV-2) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA
(BVDV)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Paula Stricker Cueto

Santa Maria, RS, Brasil.

2010

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE
ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS FRENTE AO CALICÍVIRUS
FELINO (FCV), ADENOVÍRUS CANINO 2 (CAV-2) E VÍRUS
DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV)**

por

Ana Paula Stricker Cueto

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves

Co-orientadora: Prof. Dr^a Luciane Teresinha Lovato

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL
DA PRÓPOLIS FRENTE AO CALICÍVIRUS FELINO (FCV),
ADENOVÍRUS CANINO 2 (CAV-2) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL
BOVINA (BVDV)**

elaborada por

Ana Paula Stricker Cueto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Sydney Hartz Alves, Dr.

(Presidente/Orientador)

Mário Celso Sperotto Brum, Dr. (Unipampa)

Sônia de Avila Botton, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 3 de dezembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por ter me permitido experimentar de vitória, derrotas, alegrias, e tristezas.

Aos meus pais pelo amor incondicional, apoio e grande força que eles transmitem para mim.

A minha vózinha querida, que infelizmente em meio a essa jornada me deixou, mas que está sempre presente no meu pensamento, o seu olhar de admiração nunca sairá da minha memória.

As minhas irmãs, Odith e Melissa, as quais amo muito.

Ao meu namorado Ronan, pela paciência, carinho e principalmente pelo seu amor.

Ao meu orientador Prof.Dr.Sydney Hartz Alves, pela competência, paciência e estímulo na condução do meu trabalho.

A professora Dra Luciane Lovato, minha co-orientadora, pela competência, por toda a paciência, calma e amizade que sempre dedicou a mim, mais que uma professora, uma amiga sempre com uma palavra de carinho nos momentos difíceis.

Aos professores Dr.Rudi Weiblein e Dr.Eduardo Flores que me acolheram no laboratório de virologia.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de virologia, pessoas maravilhosas que me receberam de braços abertos, e me transmitiram além de conhecimento, amizade e muito carinho.

As minhas grandes amigas de faculdade, Andriele , Carol e principalmente a Aline, nossa amizade é algo muito importante para mim.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS FRENTE AO CALICÍVIRUS FELINO (FCV), ADENOVÍRUS CANINO 2 (CAV-2) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV)

AUTORA: ANA PAULA STRICKER CUETO

ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 3 dezembro de 2010.

Os vírus são os agentes etiológicos de um grande número de enfermidades em seres humanos e animais, no entanto, há um pequeno número de fármacos antivirais disponíveis para o uso que é feito quase exclusivamente na medicina humana. Estudos demonstram que a própolis apresenta variada atividade biológica frente a vírus, bactérias e fungos. Sua composição química é bastante diversa, podendo variar conforme a época, vegetação e área de coleta. A atividade antiviral de extratos aquosos e etanólicos de própolis já foi descrita para alguns vírus humanos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antiviral do extrato de própolis frente a dois vírus causadores de doença respiratória em pequenos animais, o calicivírus felino (FCV) e o adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), e também ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Foram testadas neste experimento duas amostras de extrato etanólico de própolis, uma delas obtida comercialmente e a outra extraída no laboratório. Para realizar este estudo utilizou-se o método colorimétrico do MTT (3-(4,5 dimetiliazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo), através do qual determinou-se a concentração citotóxica a 50% (CC₅₀), concentração inibitória a 50% (IC₅₀) e o índice terapêutico (IT=IC₅₀/CC₅₀). Os extratos de própolis foram adicionados ao cultivo celular em diferentes momentos da infecção viral. Estes foram incluídos antes da inoculação viral, depois da inoculação viral, e antes e depois da inoculação viral. As duas amostras de própolis apresentaram similaridades na análise qualitativa e pequenas diferenças na análise quantitativa. A CC₅₀ destes extratos variou de 251 a 343µg/ml sendo que o extrato comercial apresentou-se ligeiramente menos tóxico. Ambos os extratos demonstraram melhor atividade antiviral quando adicionados anteriormente à inoculação viral apresentando ITs que variaram de 6 a 13. Os melhores resultados foram obtidos com o própolis extraído no laboratório. O BVDV foi o vírus que demonstrou maior sensibilidade ao extrato etanólico de própolis nas condições experimentais aplicadas. Levando-se em consideração os resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato etanólico de própolis apresenta potencial para futura utilização como fármaco no tratamento de doenças respiratórias causadas pelo CAV2 e que o mecanismo de ação sobre o BVDV deve ser avaliado com maiores detalhes com vistas ao vírus da hepatite C (HCV).

Palavras – chave: *extrato de própolis*; vírus respiratórios; calicivírus; adenovírus; BVDV.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

AUTHOR: ANA PAULA STRICKER CUETO
ADVISER: SYDNEY HARTZ ALVES

Date and Place of the Defense: Santa Maria, 3 de dezembro, 2010.

Viruses are etiologic agents of a great number of diseases of human beings and animals. However, there are only a little amount antiviral medicines available that is almost exclusively used in human health. Several studies have demonstrated that propolis has biological activities against virus, bacteria and fungi. Its chemical composition is diverse varying according to season, plants available and collection. The antiviral activity of ethanolic extracts of propolis have already been described for some human viruses. The aim of this study was to evaluate the antiviral activity of propolis ethanolic extracts against two viruses causing respiratory disease in small animals, the feline calicivirus (FCV) and canine adenovirus 2 (CAV-2), and also the bovine diarrheal disease virus (BVDV). Two samples of ethanolic extracts of propolis were used; one obtained in the lab and another obtained commercially. In order to perform the experiments the MTT test ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was used to determine the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀), the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and, the therapeutic index (TI=IC₅₀/CC₅₀). The propolis extracts were added to the cell cultures in different moments of the viral infection. They were included before virus inoculation, after virus inoculation, and before and after virus inoculation. The two propolis samples showed similarities in the qualitative analysis but they had small differences in the quantitative analysis. The CC₅₀ of the extracts varied among 251 and 343 µg/ml and the commercial extract showed less toxicity. Both extracts demonstrated better antiviral activity when added before virus inoculation and the ITs varied from 6 to 13. The best results were obtained with the propolis extracted in the lab. The BVD was the virus showing the greater sensitivity to the ethanolic extracts in the conditions applied. Taken all the data together, it can be concluded that the ethanolic extract of propolis has a potential for future use as a medicine in the therapy of respiratory disease caused by CAV-2, and, also, that the action mechanisms on BVDV should be better evaluated in detail regarding the hepatitis C virus (HCV).

Key words: *propolis extract; respiratory viruses, calicivirus, adenovirus; BVDV.*

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1- Artigo

TABELA 1 – Determinação da concentração causadora de 50% de destruição das células (CC ₅₀) do extrato de própolis frente às células MDBK, CRFK e MDCK e atividade antiviral do extrato de própolis frente ao BVDV, CAV-2 e FCV.....	43
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

FIGURA 1- Cromatograma.....	44
-----------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BVDV- Vírus da diarreia viral bovina

BoHV5- Herpesvírus bovino tipo 5

CAPE- Éster fenetil ácido caféico

CAV -2 – Adenovírus canino tipo 2

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

CC₅₀- Concentração que causa citotoxicidade em 50 % das células

CRFK- “ Crandell-Ress Feline Kidney”

ECP – Efeito Citopático

FCV- Calicivírus felino

HEP-2- Hepatocellular carcinoma

HSV- Herpes vírus

HIV- Vírus da imunodeficiência adquirida

HCV- Vírus da hepatite C

IC₅₀- Concentração que inibiu 50% do efeito citopático

IS- índice de seletividade

IT- índice terapêutico

MDBK- Madin-Darby Bovine Kidney Cells

MDCK- Madin Darby canine kidney

MEM- Meio essencial Mínimo

MTT- 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo

Nm- Nanômetro

RNA- Ácido ribonucléico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1. Própolis.....	17
3.2. Vírus da diarreia viral bovina.....	22
3.3. Calicivírus felino	23
3.4. Adenovírus canino.	24
4. CAPÍTULO 1.....	26
5. CONCLUSÕES.....	45
6.REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, eles dependem da estrutura, maquinário e energia das células para sua sobrevivência (CARTER & SAUNDERS, 2007). Há um grande número de vírus circulando nas diferentes espécies de seres vivos e dentre estes, alguns são altamente patogênicos (FLORES, 2007). A presença dos vírus como agentes de importantes enfermidades em humanos e animais vêm sendo registradas desde a antiguidade (RODRIGUES et al., 2007, ALFIERI et al., 2007).

A alta taxa de replicação dos vírus e os erros cometidos por enzimas responsáveis por esta replicação, principalmente nos vírus com ácido nucléico do tipo RNA; levam a mutações que poderão promover modificações no material genético que influenciarão na evolução viral (CANN et al., 2005). Este mecanismo aliado a outros atributos virais como variedade de meios de transmissão, possibilidade de troca de material genético e a capacidade de alguns destes patógenos persistirem no hospedeiro (JASSIM & NAJI, 2003), facilitam a emergência de novos vírus como o Ebola e HIV.

A replicação intracelular dos vírus dificulta o desenvolvimento de fármacos contra estes agentes pela alta toxidez destas substâncias para as células (THRELKED & HIRSCH, 1996, JASSIM & NAJI, 2003, DE CLERCQ, 2004). O tratamento da grande maioria das doenças víricas é sintomático, ou seja, medicamentos são aplicados focando o alívio dos sintomas, mas não atuam sobre os vírus (DE CLERCQ, 2004). O número de medicamentos aprovados para o uso não chega a 50 e a maioria deles é direcionado para o HIV (DE CLERCQ, 2004).

Uma ampla variedade de produtos naturais e seus derivados têm sido estudados como promissores candidatos no tratamento de infecções causadas por vírus (GEKKER et al., 2005). O vírus do herpes simples (HSV), vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da hepatite B (HBV) e alguns vírus que causam doenças respiratórias agudas foram inibidos satisfatoriamente por uma variedade de extratos de plantas (BÚFALO et al., 2009).

Dentre o variado número de produtos naturais estudados; a própolis, substância resinosa coletada pelas abelhas tem demonstrado uma ampla variedade de atividades farmacológicas entre elas a atividade antimicrobiana (DRAGO et al., 2007). A composição da própolis é qualitativamente e quantitativamente variável, dependendo de vários fatores (SCHNITZLER et al., 2009). A composição e diferentes atividades propostas da própolis brasileira tem sido bastante estudada por grupos de pesquisa brasileiros e internacionais que a qualificam como uma das melhores própolis disponíveis (NETO et al., 2002).

O extrato de própolis e seus derivados já foram testados para sua atividade antiviral contra alguns vírus humanos (VYNOGRAD et al., 2000, AMOROS et al., 1992) e de animais (KUJUMGIEV et al., 1999); apresentando bons resultados em grande parte dos casos. Atividade antiviral já foi descrita contra o herpesvírus humano tipo 1 (HSV1) (HULEIHEL & ISANU, 2002, AMOROS et al., 1992) e 2 (HSV2) (VYNOGRAD et al., 2000, SCHNITZLER et al., 2010), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ITO et al., 2001, GEKKER et al., 2005), e vírus da influenza aviária (KUJUMGIEV et al., 1999).

A pesquisa de antivirais tem concentrado esforços principalmente na identificação de substâncias que tenham boa atuação sobre vírus que acometem humanos (JASSIM & NAJI, 2003, DE CLERCQ, 2004). Entretanto uma contingência de mercado aliada à mudança de atitude das pessoas com relação aos seus animais de estimação tem estimulado uma maior busca por medicamentos principalmente para cães e gatos.

O calicivírus felino (FCV) é um vírus altamente patogênico de gatos com ampla distribuição na população felina. Dentre os sinais clínicos mais freqüentes estão lesões ulcerativas orais e infecções no trato respiratório superior acompanhado de descarga nasal e ocular (RADFORD et al., 2007). O adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) se apresenta como um dos principais causadores de traqueobronquite em cães, porém alguns trabalhos também registram a presença dele em episódios de gastroenterite (BUONAVOGLIA et al., 2007).

O vírus da diarreia viral bovina está associado a doenças gastroentéricas, respiratórias e reprodutivas, porém têm sido usado como modelo *in vitro* para estudos de antivirais contra o vírus da hepatite C (HCV) devido a sua similaridade na estrutura

viral, organização genômica e replicação (ROMERO et al., 2006 ; YANAGIDA et al., 2004).

Com base na argumentação acima, esta dissertação tem como objetivo avaliar a atividade antiviral do extrato de própolis frente ao calicivírus felino (FCV), adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antiviral do extrato de própolis frente a vírus patogênicos de animais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato de própolis frente aos diferentes cultivos celulares: MDBK, MDCK e CRFK.
- Testar a atividade antiviral *in vitro* do extrato de própolis contra o calicivírus felino (FCV), adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Própolis

Dentre os vários produtos naturais utilizados ao longo dos anos a própolis se destaca como um dos mais antigos produtos empregados na medicina popular. O interesse neste produto tem aumentado internacionalmente a cada dia. A própolis brasileira tem sido alvo de grande interesse internacional devido ao Brasil ser o terceiro maior produtor mundial e ao fato da própolis brasileira ser considerada em alguns países, como o Japão, uma das melhores do mundo (NETO et al., 2002).

A própolis é uma resina produzida com material coletado de diferentes plantas pelas abelhas melíferas e utilizada na proteção das colméias principalmente contra microrganismos (KUJUMGIEV et al., 1999, BURDOCK, 1998). Várias ações farmacológicas já foram demonstradas em estudos *in vitro*, como antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, hepato-protetora, anti-tumor e anti-oxidante (BURDOCK, 1998). A atividade antimicrobiana da própolis coletada em diferentes localizações geográficas no Brasil já foi descrita por pesquisadores brasileiros (LOGUERCIO et al., 2006, SANTOS et al, 2002, SANTOS et al., 2005) e estrangeiros (ITO et al. 2001, BANSKOTA et al., 2001, SFORCIN et al., 2000, KUJUMGIEV et al., 1999).

A composição da própolis pode variar de acordo com a época do ano, o tipo de vegetação e a área da coleta (PARK et al., 2002). Geralmente é composta de 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (SFORCIN et al., 2000). A composição química é complexa sendo que, segundo alguns pesquisadores, os flavonóides constituem o grupo majoritário que seria responsável por algumas das ações farmacológicas atribuídas a esta substância (HULEIHEL & ISANU, 2002, VYNOGRAD et al., 2000, AMOROS et al., 1992).

Na análise dos constituintes da própolis encontramos uma ampla variedade de compostos químicos. A própolis contém mais de trezentos constituintes incluindo ácido cinâmico, ácido benzóico e seus ésteres, substituintes de ácido fenólicos e ésteres, flavonóides, aminoácidos, além de vitamina B1, B2, B6, C, E e minerais como prata, céσιο, mercúrio, lantânio, antimônio, cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício foram identificados em amostras de própolis (SONG et al., 2002; BANKOVA et al., 1995). A composição química de própolis de várias regiões já tem sido descrita. Na Europa e China a composição da própolis é predominantemente de flavonóides (TEIXEIRA et al., 2008), já a própolis iraniana apresenta predominância de ácidos aromáticos, ésteres caféicos, cumarínicos e flavonóides (TEIXEIRA et al., 2008). Roy e colaboradores (2010) verificaram que a própolis indiana apresentava um maior teor de polifenóis que de flavonóides. Resultados semelhantes foram descritos por Banskota e colaboradores (2010) sobre a própolis holandesa; porém neste caso além de polifenóis e flavonóides também foram encontrados alguns novos derivados do glicerol como parte da composição. No Brasil, devido à ampla diversidade da flora, há uma variação muito grande de compostos isolados nas amostras de própolis (TEIXEIRA et al., 2008, BANSKOTA et al., 2002, ROY et al., 2010).

A análise de amostras de própolis de três localidades do estado de Minas Gerais (Sudeste brasileiro) identificou um total de quarenta substâncias, entre elas fenilpropanóides, sesquiterpenos e diterpenóides (TEIXEIRA et al., 2008). Essas amostras foram coletadas mensalmente durante um ano. Foram encontradas diferenças entre as amostras das três regiões e diferenças dentro das mesmas amostras, porém variando o mês de coleta, demonstrando como as diferenças na época da colheita podem modificar a constituição química. Uma das fontes de própolis brasileira mais estudada e valorizada atualmente é a denominada própolis verde ou própolis de alecrim (*Baccharis dracunculifolia*). E, recentemente, um novo tipo de própolis brasileira também vem ocupando um importante espaço, a própolis vermelha, coletada nas regiões norte do país ela apresenta coloração avermelhada e também é típica em Cuba e Venezuela (TRUSHEVA et al., 2006).

A atividade antiproliferativa da própolis sobre células tumorais tem sido demonstrada e alguns constituintes envolvidos nesta atividade já foram isolados.

BANSKOTA et al. (2000) descreveu a atividade citotóxica do ácido cinâmico, flavonóides e derivados como CAPE e artepillin C. Posteriormente o mesmo grupo de pesquisadores (BANSKOTA et al. 2002) demonstrou que outros isolados como benzil, fenetil e cafeato de cinamil possuem potente atividade antiproliferativa frente a linhagens de células de melanoma e mais especificamente para células de carcinoma de cólon. Em outro estudo, o componente 7-hidroxi-6-metoxiflavanona demonstrou ser tão potente quanto as drogas anticâncer já usadas como a doxorubicina (LI et al., 2008). BÚFALO et al. (2007) descreve o efeito citotóxico da própolis em células de carcinoma epidermóide de laringe humana. Os resultados obtidos no estudo sugerem que a própolis apresenta efeito citotóxico dose e tempo dependentes, uma vez que altas concentrações de própolis apresentam um pequeno tempo de ação, pois destruíram as células em pouco tempo, enquanto que as concentrações mais baixas foram efetivas a longo prazo. O tratamento com própolis durante três dias aumentou também a atividade citotóxica das células natural killer (NK) frente a linfomas em camundongos (BÚFALO et al., 2007).

A ação antioxidante é outra atividade evidenciada por diversos pesquisadores para a própolis. Extratos aquosos e etanólicos de própolis inibiram eficientemente a formação de radicais livres (ROY et al., 2010). Teixeira e colaboradores (2008) testaram extratos metanólicos de duas regiões diferentes e detectaram atividade antioxidante somente em uma das amostras. Os autores relatam a presença de substâncias fenólicas neste extrato. O sinergismo em relação aos componentes da própolis é também algo muito questionado, pois em algumas situações o extrato de própolis foi mais ativo do que seus compostos individuais (SCHINTZLER et al., 2010). Entretanto quando a atividade antioxidante da própolis foi testada na presença e ausência do éster fenetil ácido caféico (CAPE) (RUSSO et al., 2002); observou-se melhor atividade do componente isolado. O resultado demonstrou que o extrato que continha CAPE apresentava maior atividade que o extrato que não continha, e quando se usou a CAPE isolada o resultado foi ainda melhor, sugerindo que a atividade deve-se a este componente.

A própolis apresentou atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos em diferentes oportunidades. A atividade de um multicomposto de própolis denominado

Actichelated, e de um extrato hidroalcoólico de própolis foi testada frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas Aeruginosa* (DRAGO et al., 2007). A atividade dos extratos foi principalmente bacteriostática, porém em altas concentrações estes extratos apresentaram atividade bactericida; sendo que o multicomposto foi mais potente que o extrato hidroalcoólico (DRAGO et al., 2007). Em outra ocasião, cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* também foram inibidos *in vitro* por extratos de própolis (CARDOSO et al., 2010). Em diversos estudos detectou-se também que a eficácia de antibióticos foi aumentada pela presença de própolis (MERESTA & MERESTA, 1985).

O crescimento *in vitro* de cepas de *Candida albicans* foi inibido em 94,4%, com efeito fungistático em baixas concentrações e fungicida quando utilizadas altas concentrações (QUINTERO-MORA et al., 2008). Resultados semelhantes foram obtidos por Cardoso e colaboradores (2010), testando o extrato de própolis frente a *Malassezia pachydermatis*.

O extrato de própolis e seus derivados já foram testados para sua atividade antiviral contra alguns vírus humanos (VYNOGRAD et al., 2000, AMOROS et al., 1992) e de animais (KUJUMGIEV et al., 1999). A atividade antiviral contra o herpesvírus humano tipo 1 (HSV1) foi constatada *in vitro* para o extrato de própolis (HULEIHEL & ISANU, 2002, AMOROS et al., 1992) e seus derivados (DRAGO et al., 2007). O tratamento com extrato de própolis de camundongos infectados com HSV1 via intraperitoneal e coelhos infectados através da córnea evitou o aparecimento de manifestações clínicas da doença nestes modelos (HULEIHEL & ISANU, 2002). O uso tópico de própolis contra o HSV2 genital pareceu ser mais eficiente na cura das lesões do que o aciclovir e o placebo aos quais foi comparado (VYNOGRAD et al., 2000).

Resultados promissores também foram observados *in vitro* frente ao HIV. Um alto índice terapêutico foi detectado em derivados químicos (IT>186) e extrato metanólico (IT>171) de própolis brasileira quando testado contra o HIV em cultivo celular de linfócitos T (H9) (ITO et al., 2001). Em experimentos similares, Gekker et al (2005) demonstraram que a própolis inibiu a expressão viral do HIV em linfócitos T CD4+ e células da micróglia.

Em estudos para detecção de atividade antiviral utilizando cultivos celulares, deve-se levar em consideração a toxicidade dos compostos em relação às células. As concentrações de própolis utilizadas nos ensaios antivirais variaram bastante nos experimentos descritos e vão desde 5% (ISANU & HULEIHEL, 2002) até 0,0003% (SCHNITZLER et al., 2009). Estas concentrações equivalem à maior concentração que não promoveram alterações morfológicas na célula. Essa ampla faixa de concentração provavelmente deve-se a variabilidade na composição da própolis, provocada pela região geográfica onde foi coletada, planta originária e tipo de abelha que a produziu.

O mecanismo de ação da própolis sobre os vírus ainda não tem sido esclarecido. O extrato etanólico de própolis atuou sobre a partícula do herpes simples tipo 2 (HSV2) antes do contato do vírus com célula, sugerindo que a ação do extrato seria na estrutura do envelope do vírus ou modificação na estrutura dos componentes necessários para adsorção ou entrada do vírus na célula (NOLKEMPER et al., 2010). O mesmo extrato apresentou resultados semelhantes sobre o HSV1 demonstrando que o vírus livre é mais sensível à própolis, o que levou os autores a sugerir que a administração da própolis antes ou no momento da infecção promoveria um maior efeito de inibição no vírus (SCHNITZLER et al., 2009). Outro estudo com HSV1 obteve resultados diversos, uma vez que o extrato de própolis atuou quando incubado com a célula antes da infecção viral, mas não apresentou a mesma atividade quando incubado com as partículas virais antes da inoculação em células (ISANU & HULEIHEL, 2002).

Além dos usos descritos acima, a própolis já tem sido testada com outras finalidades como o seu uso como adjuvante e seu efeito estrogênico. O uso do extrato de própolis como adjuvante em uma vacina para o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV5), teve resultados excelentes, aumentou a eficiência da vacina, aumentando o nível de anticorpos contra o vírus (FISCHER et al., 2007). O efeito estrogênico da própolis foi avaliado através de várias técnicas por Song e colaboradores (2002), sendo que os resultados demonstraram que o extrato ativou os receptores estrogênicos, porém de uma maneira menos eficiente que o 17β estradiol usado como controle no ensaio.

3.2 Vírus da diarreia viral bovina

O BVDV é um dos principais patógenos de bovinos e está mundialmente distribuído. A infecção por este vírus pode ocorrer de forma clínica ou subclínica. Animais infectados com BVDV podem apresentar uma enfermidade gastroentérica aguda, doença respiratória, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, imunossupressão e distúrbios reprodutivos. A infecção da fêmea gestante pelo BVDV entre 40 e 120 dias de gestação pode resultar no nascimento de bezerros persistentemente infectados. Este vírus já foi isolado do rebanho bovino de vários Estados brasileiros (FLORES et al., 2005).

O vírus da hepatite C (HCV) infecta indivíduos adultos sendo transmitido principalmente por via parenteral. Esta infecção é geralmente assintomática, mas, aproximadamente 70% a 80% das pessoas infectadas serão portadores crônicos do vírus. A infecção com o HCV frequentemente causa hepatite crônica e progressiva que pode levar a cirrose hepática, doença hepática terminal e carcinoma hepatocelular (LIANG et al., 2000). Não existe vacina disponível para o vírus e o tratamento para a infecção é realizado através da droga ribavirina e o interferon-alfa. Esta terapia é efetiva apenas para alguns grupos de pacientes e não é muito tolerada por muitos destes. A inexistência de um cultivo celular ao qual o HCV seja adaptado e replique é um fator complicador do estudo de antivirais (BIDAWID et al., 2003).

O BVDV está classificado na família *Flaviviridae* juntamente com patógenos humanos como o vírus da hepatite C (HCV). Os vírus desta família possuem um RNA de sentido positivo e apresentam-se como partículas esféricas de 40 a 60nm, envolvidos por um envelope lipídico. O BVDV apresenta dois genótipos denominados BVDV I e BVDV II. Este vírus apresenta também dois biótipos; classificados em citopático e não-citopático, de acordo com a indução ou não de efeito citopático em células. Ambas as cepas, citopática e não-citopática, replicam em cultivo celular (MURPHY et al., 1999; FLORES et al., 2005), uma das razões que permitem a utilização da cepa citopática do BVDV como modelo para o HCV.

Além da semelhança estrutural, os vírus da família *Flaviviridae* apresentam um ciclo replicativo com passos gerais comuns a todos. O BVDV e o HCV apresentam também similaridades na sua organização genômica e apesar de apresentarem tamanhos diferentes (HCV=9,6kb e BVDV=12,6kb), os vírus codificam para proteínas funcionalmente equivalentes (LINDENBACH, 2001; BIDAVID et al., 2003, BUCKWOLD et al., 2003). Os vírus apresentam semelhanças também na biologia, uma vez que os dois infectam seus respectivos hospedeiros de forma persistente (BIDAVID et al., 2003; FLORES et al., 2005, BUCKWOLD et al., 2003). Antivirais que interfiram em alguns pontos comuns aos dois vírus podem ser testados no BVDV (BIDAVID et al., 2003).

3.3 Calicivírus Felino

O calicivírus felino é o agente etiológico da calicivirose felina. Esta é uma doença respiratória de gatos que apresenta como manifestações clínicas conjuntivite, rinite, traqueobronquite, pneumonia e vesículas no epitélio oral que evoluem para úlceras (RADFORD et al., 2007). Calicivírus é classificado na família *Caliciviridae*, são pequenos vírus não envelopados, de simetria icosaédrica e diâmetro de 35-40nm. O genoma é constituído por uma cadeia simples de RNA de 7,4 a 7,7 kb e sentido positivo (MURPHY et al, 1999). O FCV replica bem em células de origem felina causando efeito citopático e a identificação é realizada através do teste de imunofluorescência ou RT-PCR (transcriptase reversa reação de polimerase em cadeia).

O FCV é um vírus muito resistente no meio ambiente, altamente contagioso, e encontra-se amplamente distribuído na população felina (NEILL, 2007). Este agente é uma das causas principais de doenças respiratórias em felinos juntamente com o herpesvírus felino tipo 1 (FHV1) (RADFORD et al., 2007, GASKELL et al., 2007). Por ser um vírus RNA o FCV apresenta altas taxas de mutações durante a replicação viral na célula (RADFORD et al., 2007). Os gatos podem manter o vírus persistentemente após a infecção por longos períodos e excretá-lo nas secreções oronasais (KREUTZ et al., 1998).

As propriedades do vírus citadas acima dificultam o controle e profilaxia da doença. Vacinas vivas e inativadas estão disponíveis e são regularmente aplicadas em felinos domésticos (RADFORD, 2007). No entanto a eficácia destas vacinas na proteção contra as manifestações clínicas tem sido questionada (LAURITZEN et al., 1998). Medicamentos antivirais para o tratamento deste vírus não existem e o tratamento é realizado de forma sintomática (RADFORD et al. 2007).

O norovírus é um vírus humano que induz sintomas de vômito severo, diarreia aquosa, náusea, cólicas abdominais, febre e mal-estar geral (HUTSON et al., 2004). O norovírus humano apresenta uma organização genômica muito similar àquela do FCV e o vírus da doença hemorrágica dos coelhos (RHDV) (CLARKE & LAMBDEM, 2000), além disso, algumas estratégias usadas na replicação do vírus recentemente foram demonstrados serem similares (KUYUMCU et al., 2004).

O FCV tem sido usado em vários testes como modelo para o norovírus humano pelas similaridades genômicas, bioquímicas e biofísicas; e também pela facilidade de replicação em cultivo celular. A utilização do FCV como modelo para o estudo de antivirais foi testada recentemente. O efeito da lactoferrina bovina e da lactoferrina B sobre a replicação do calicivírus felino foi determinada em células CRFK (Crandell-Reese feline kidney). Ambas as substâncias foram capazes de interferir com a replicação do FCV *in vitro* (MCCANN et al., 2003).

3.4 Adenovírus canino tipo 2

O adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) pertence à família *Adenoviridae*, gênero *Mastadenovirus*; apresentam vírions hexagonais, icosaédricos, sem envelope e com genoma viral de DNA de fita dupla (MURPHY et al., 1999). O CAV-2 replica em células de linhagem MDCK (“Madin Darby canine kidney”), a replicação é acompanhada por alterações na morfologia das células promovendo um efeito citopático resultando em lise celular (MURPHY et al., 1999).

Este vírus é um dos agentes envolvidos na traqueobronquite infecciosa canina ou tosse dos canis que é uma enfermidade geralmente multifatorial envolvendo outros vírus e também algumas bactérias (MORAES & COSTA, 2007). A *Bordetella bronchiseptica*, o parainfluenzavírus canino (CPIV), os reovírus canino tipos 1, 2 e 3, o *Mycoplasma* spp e o *Ureaplasma* spp são microrganismos que podem estar envolvidos também nesta síndrome (MORAES & COSTA, 2007).

A infecção resulta em lesão no epitélio respiratório, inflamação aguda e perda das funções dos cílios das vias aéreas. As manifestações clínicas comumente envolvem descarga nasal e ocular, tonsilite, traqueíte, bronquite, faringite e eventualmente broncopneumonia (MURPHY et al., 1999, MORAES & COSTA, 2007, BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). A infecção ocorre principalmente por aerossóis mas também pode ocorrer por fômites (HU et al., 2001; BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007).

O CAV-2 é antigenicamente relacionado ao adenovírus canino tipo 1 (CAV-1) o agente etiológico da hepatite infecciosa canina (BASS et al., 1980, HU et al., 2001). Os dois vírus induzem sorologia e proteção cruzada e a imunização para um dos vírus induz proteção contra ambos (BASS et al., 1980, HU et al., 2001, BUONAVOGLIA et al., 2008). Atualmente são utilizadas vacinas contendo o antígeno do CAV2 para a proteção contra ambos vírus. A utilização do CAV1 como antígeno da vacina levou a reações imunes com deposição de complexos antígeno-anticorpo na córnea com produção de edema local (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007, MORAES & COSTA, 2007).

A imunização dos filhotes entre a sexta e a décima semana de vida é a forma de controle desta enfermidade (MORAES & COSTA, 2007) uma vez que o tratamento deste tipo de infecção é apenas paliativo (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). A distribuição do CAV2 é mundial (MURPHY et al., 1999, BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007) e no município de Santa Maria estudos de soroprevalência em uma população canina não vacinada regularmente demonstrou a presença de anticorpos em 43% dos animais testados (DEZENGRINI et al., 2006).

4 CAPÍTULO 1

Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino (FCV), adenovírus canino 2 (CAV2) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

A ser submetido à revista Ciência Rural

Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino (FCV), adenovírus canino 2 (CAV2) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

Antiviral activity of propolis extracts against feline calicivirus (FCV), canine adenovirus 2 (CAV2), and bovine viral diarrhea virus (BVDV)

Ana Paula Cueto¹Sydney Hartz Alves² Marciele Pilau, Rudi Weiblen, Luciane Teresinha Lovato²

Resumo

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas à qual têm sido atribuídas várias atividades biológicas, entre elas a atividade antimicrobiana. Neste artigo a atividade antiviral de dois extratos etanólicos de própolis foi testada frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV), adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) e calicivírus felino (FCV). Um dos extratos foi obtido por extração etanólica de própolis da região de Santa Maria (RS) e o outro foi obtido comercialmente de uma empresa de Minas Gerais. A análise do extrato de própolis através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) identificou a presença de alguns flavonóides como: rutina, quercetina e ácido gálico. O teste de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) foi utilizado para a detecção de citotoxicidade e da atividade antiviral. As concentrações efetivas da própolis foram altamente diluídas porque os extratos apresentaram-se bastante tóxicos para os cultivos celulares testados. Ambos os extratos apresentaram atividade antiviral frente ao BVDV e CAV-2 quando incubados com a célula anteriormente à inoculação viral. O extrato obtido no laboratório apresentou valores mais altos de índice terapêutico ($IT=CC_{50}/IC_{50}$) comparado à outra amostra. Em resumo, apesar da alta toxicidade frente aos cultivos celulares, os extratos de própolis apresentaram atividade antiviral em níveis superiores aos já descritos na literatura para a consideração de compostos como potenciais candidatos a antivirais.

Palavras – chave: *extrato de própolis*; vírus respiratórios; calicivírus; adenovírus; BVDV.

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance produced by bees for which several biological activities have been attributed. In this article, the antiviral activity of two propolis extracts was tested against bovine viral diarrhea virus (BVDV), canine adenovirus type 2 (CAV-2), and feline calicivirus (FCV). One of the extracts was obtained by ethanolic extraction of propolis from the Santa Maria (RS) region, while the other was bought from a Minas Gerais industry. The high efficiency liquid chromatography (HPLC) analysis detected the presence of some flavonoids like rutin, quercetin, and gallic acid. The MTT test was applied in order to detect the cytotoxicity and also the antiviral activity. The effective concentrations of propolis were highly diluted once the extracts showed high cytotoxicity to the cell cultures. Both extracts showed antiviral activity against BVDV and CAV-2 when incubated with the cell cultures before viral inoculation. The extract obtained in the lab showed the highest therapeutic index ($TI = CC_{50} / IC_{50}$). Thus, the propolis extracts showed antiviral activity over the levels suggested by researchers to consider a product as a potential candidate to an antiviral, even though the extracts were highly toxic.

Key words: propolis extract, respiratory viruses, calicivirus, adenovirus, BVDV

1 INTRODUÇÃO

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas, formando uma mistura de exsudatos de plantas enriquecido com produto de saliva e cera (DRAGO et al., 2007; BÚFALO et al., 2009). Várias ações farmacológicas já foram demonstradas em estudos *in vitro*, como antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, hepato-protetora, anti-tumor e anti-oxidante (BURDOCK, 1998). Esta ampla variedade de atividades biológicas se deve à grande variabilidade qualitativa e quantitativa dos componentes químicos da própolis, dependentes dos tipos de planta da qual o material é coletado, época do ano e localização geográfica (SCHNITZLER et al., 2009).

A própolis brasileira tem sido alvo de grande interesse internacional devido ao Brasil ser o terceiro maior produtor mundial e ao fato da própolis brasileira ser considerada em alguns países, como o Japão, uma das melhores do mundo (NETO et al., 2002). A atividade antimicrobiana da própolis coletada em diferentes localizações geográficas no Brasil já foi descrita por pesquisadores brasileiros (LOGUERCIO et al., 2006, SANTOS et al., 2002, SANTOS et al., 2005) e estrangeiros (ITO et al. 2001, BANSKOTA et al., 2001, SFORCIN et al., 2000, KUJUMGIEV et al., 1999).

O extrato de própolis e seus derivados já foram testados para sua atividade antiviral contra alguns vírus humanos (VYNOGRAD et al., 2000, AMOROS et al., 1992) e de animais (KUJUMGIEV et al., 1999); apresentando bons resultados em grande parte dos casos. Atividade antiviral já foi descrita contra o herpesvírus humano tipo 1 (HSV1) (HULEIHEL & ISANU, 2002, AMOROS et al., 1992) e 2 (HSV2) (VYNOGRAD et al., 2000, SCHINTZLER et al.,

2010), vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ITO et al., 2001, GEKKER et al., 2005), e vírus da influenza aviária (KUJUMGIEV et al., 1999).

Este artigo descreve a atividade antiviral de dois extratos etanólicos de própolis de duas diferentes origens frente ao adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), calicivírus felino (FCV) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV). O CAV-2 é o agente etiológico da traqueobronquite infecciosa canina ou tosse dos canis, enfermidade respiratória multifatorial que pode envolver também outros vírus e bactérias (BUONAVOGLIA et al., 2008). O FCV causa a calicivirose felina, doença respiratória de gatos que apresenta como manifestações clínicas conjuntivite, rinite, traqueobronquite, pneumonia e vesículas no epitélio oral que evoluem para úlceras (RADFORD et al., 2007). O BVDV pode causar enfermidade gastroentérica aguda, doença respiratória e distúrbios hemorrágicos e reprodutivos em bovinos (FLORES et al., 2005). Este vírus tem também sido utilizado como um modelo para o vírus da hepatite C humana em estudos de antivirais pelas semelhanças moleculares e estratégias de replicação (BUCKWOLD et al., 2003). Os extratos de própolis inibiram a atividade do CAV-2 e do BVDV quando incluídos na célula antes da inoculação viral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extrato etanólico de própolis

Foram utilizadas neste trabalho duas amostras de própolis, uma obtida em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil; e outra obtida da empresa Prodapys (Minas Gerais). A amostra santamariense foi triturada em pequenos pedaços e extraída utilizando etanol 70% (sendo 30% própolis bruta e 70 % álcool etílico 70%). A solução foi estocada à temperatura ambiente e

protegida da luz por cerca de 45 dias, após este período o sobrenadante foi colhido e utilizado nos experimentos.

2.2 Análise do extrato de própolis por CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada por cromatógrafo líquido (Shimadzu, Kyoto, Japão) com injetor automático (SIL-20A), bombas DGU 20A5 com integrador CBM 20 e detector UV-VIS (DAD-SPD-M20A), Software LC SP1. As análises cromatográficas foram realizadas em condições isocráticas utilizando coluna C18 (4,6mm x 150 mm) a fase móvel usada foi metanol/acetoneitrila/água (40:15:45) contendo 1% Ácido Acético. O fluxo e o volume de injeção foram 0,9mL/min e 20µL respectivamente. A leitura foi executada em comprimento de onda de 257nm. Essas técnicas foram realizadas no Departamento de Farmácia Industrial da UFSM. Os constituintes foram analisados conforme a farmacopéia brasileira. Fonte: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/index.htm>)

2.3 Cultivo celular e vírus

Foram utilizados neste trabalho três tipos de cultivo celulares: MDBK (células de linhagem de rim bovino), MDCK (células de rim canino) e CRFK (células de rim felino). As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina e anfotericina B, nas concentrações de 100 U/mL, 100 e 2,5 µg/mL respectivamente. Para a célula MDBK utilizou-se soro equino. O meio de manutenção das células nas placas era constituído de 5% de soro. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Para a realização dos testes, foram preparadas culturas de células em microplacas de poliestireno rígido com 96 cavidades de fundo plano. As cepas dos vírus da diarréia viral bovina

(BVDV) citopático Singer genótipo 1, adenovírus canino tipo 2 e calicivírus felino eram provenientes do Setor de Virologia/UFSM. Estoques dos vírus foram preparados e titulados nas respectivas células como já descrito (DEZENGRINI et al., 2006) e as alíquotas mantidas a -70°C até o momento do uso.

2.4 Ensaio de Citotoxicidade

Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 cavidades, em duplicata, e repetidos três vezes. Foram semeadas $1,6 \times 10^5$ células/ μl (número de células para cada cultivo celular foi padronizado para os testes) e incubadas por 24 horas a 37°C . A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) descrito por Mosmann (1983) e modificado por Pilau (2010). Resumidamente, alíquotas de 200 μl de diferentes concentrações do extrato de própolis foram dispensados seqüencialmente nas placas de microtitulação. Foram utilizados controles celulares e de toxicidade do etanol. Após três dias de incubação o meio de cultivo foi removido e a viabilidade das células foi determinada através da densidade ótica por leitura em espectrofotômetro 540nm. A concentração do extrato que resultou em 50 % de toxicidade (CC_{50}) foi determinada através de uma curva dose resposta

2.5 Atividade Antiviral

Para a realização dos testes antivirais as técnicas utilizadas foram semelhantes ao ensaio de citotoxicidade, as células foram infectadas com 25 μl de vírus com título de 100 TCID₅₀/ml, e incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 2 horas. Após este período de incubação o inóculo viral era retirado. Nestes testes foram incluídos o controle celular (célula e meio) e o controle do vírus (meio, célula, vírus). Os extratos foram adicionados: I) antes da inoculação viral (1h de contato

célula/extrato), II) após a inoculação viral (extrato adicionados após a inoculação viral e mantidos), e III) adicionados antes e após a inoculação viral. Após três dias de incubação o meio de cultivo foi removido e a viabilidade das células determinada através da densidade ótica por leitura em espectrofotômetro 540nm. A concentração inibitória a 50% (IC₅₀) que consiste na concentração do extrato que inibiu o efeito citopático do vírus em 50%. Posteriormente foi determinado o índice de seletividade (IS) ou índice terapêutico (IT) que é dado pela fórmula $IT = CC_{50}/IC_{50}$ também foi determinado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise dos extratos de própolis utilizados no presente experimento estão apresentados na Figura 1. Os dados obtidos com os testes de citotoxicidade e inibição viral realizados em cultivo celular *in vitro* são apresentados na Tabela 1.

A análise do extrato de própolis através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) identificou a presença de alguns flavonóides como: rutina, quercetina e ácido gálico. No cromatograma é possível visualizar a presença de picos diferentes entre as amostras de extrato de própolis comercial e de própolis extraído no laboratório. Aparentemente, não houve diferenças qualitativas entre as amostras, uma vez que os três padrões utilizados na análise estavam presentes em ambas. Porém, detectam-se pequenas diferenças em relação à altura dos picos cromatográficos; principalmente com relação ao flavonóide rutina, o que pode indicar que existem diferenças quantitativas em relação às duas amostras de própolis analisadas, o pico representando a substância rutina apresenta-se mais elevado na amostra obtida comercialmente.

A própolis é uma substância resinosa de composição complexa como já foi citado anteriormente. A composição química da própolis é determinada pelo tipo de vegetação presente nas proximidades da colméia de abelhas que a produz (SCHNITZLER et al., 2009), da época do

ano em que ocorre a coleta (PARK et al, 2002) e, ainda; pelas diferentes espécies de abelhas produtoras desta própolis (SILICI & KUTULUCA, 2005). A análise cromatográfica de 150 amostras provenientes dos três estados da região sul do Brasil, Uruguai e da Argentina demonstrou a presença de cinco diferentes grupos de composição química da própolis (PARK et al., 2002). Portanto, a diferença observada na composição das duas amostras testadas no presente artigo era um resultado de certa forma esperado, uma vez que estas amostras são provenientes de duas diferentes regiões do Brasil.

A toxicidade da própolis frente aos cultivos celulares variou entre as diferentes linhagens de células e a amostra de própolis (Tabela 1). O extrato comercial apresentou menor toxicidade quando comparado ao extrato produzido no laboratório. Ambos os extratos apresentaram toxicidade mais elevada frente à linhagem de células de rim canino (MDCK) quando comparados à linhagem de células de rim bovino (MDBK). Para a realização dos experimentos os extratos de própolis foram altamente diluídos porque na concentração original estes extratos demonstraram toxicidade incompatível com a realização das leituras do teste (dados não demonstrados). Então a concentração inicial usada no ensaio foi cerca de 200 vezes menor que a dos extratos originais que continham própolis em uma concentração de 15%.

O alto efeito citotóxico dos extratos originais utilizados nos testes aqui descritos não era esperado. O fato de ser um produto natural e a possível ausência de toxicidade para animais e humanos são vantagens atribuídas à própolis. Contudo, o efeito citotóxico das amostras de própolis em diferentes cultivos celulares tem sido descrito desde moderado até altamente tóxico. O extrato aquoso de própolis em uma concentração de 10% não apresentou toxicidade para a linhagem celular de rim de macaco verde africano (Vero), e o mesmo extrato a 20% não evidenciou efeitos adversos quando inoculado em coelhos e camundongos (HULEIHEL & ISANU, 2002). Entretanto o extrato aquoso de própolis utilizado em outro teste antiviral também

com células de rim de macaco verde africano de outra linhagem (RC-37), demonstrou uma concentração máxima não-tóxica de apenas 0,03% (SCHNITZLER et al., 2009).

A toxidez da própolis frente a algumas células de origem tumoral como as células de carcinoma epidermóide laringeal humano (HEP-2) (BÚFALO et al., 2007), e a tumores experimentais induzidos em animais; têm sugerido um efeito anti-tumoral para esta substância. Efeito citotóxico seletivo para células tumorais também já foi demonstrado para um dos constituintes da própolis, o éster fenetil ácido cafeico (CAPE) (LEE et al., 2005). Dados evidenciando que a toxicidade aparentemente não foi um problema em estudos de atividade antiviral que utilizaram células de cultivo primário reforçam esta idéia (GEKKER et al, 2005, KUJUMGIEV et al., 1999). Então, embora não haja consenso; é possível que o efeito citotóxico observado tenha sido maior devido ao uso de células de linhagem imortalizadas.

Os vírus incluídos neste teste foram escolhidos por duas razões diferentes. O adenovírus canino tipo 2 (CAV-2) e o calicivírus felino (FCV) são agentes etiológicos de doenças respiratórias nas suas respectivas espécies (BUONAVOGLIA et al., 2008, RADFORD et al., 2007), enquanto o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) têm sido bastante utilizado como um modelo de estudos de atividade antiviral para o vírus da hepatite C (HCV) (BUCKWOLD et al., 2003). Embora diferentes atividades já foram atribuídas à própolis, esta vem sendo usada desde a antiguidade tradicionalmente como um medicamento para problemas respiratórios (NETO et al., 2002) e quase que exclusivamente em humanos. Então a possível aplicabilidade deste extrato baseado no uso do mesmo em enfermidades respiratórias humanas e o fato de dois dos vírus se tratarem de doenças de animais de estimação direcionou o teste.

Os testes para determinar a atividade antiviral do extrato de própolis foram realizados em diferentes etapas da replicação viral. Os extratos de própolis foram incluídos em três momentos da infecção viral: I) as células foram pré-tratadas com o extrato antes da infecção (pré-

tratamento), II) os extratos foram adicionados após a inoculação do vírus (pós-tratamento), e III) a própolis foi incluída antes e após a inoculação do vírus (pré e pós-tratamento). Uma avaliação geral dos resultados da atividade antiviral dos extratos de própolis apresentados na Tabela 1 evidencia melhor atividade de ambos os extratos no pré-tratamento e; também, uma maior eficácia do extrato obtido no laboratório comparado ao extrato comercial.

Ambos os extratos de própolis examinados apresentaram uma melhor atividade frente ao BVDV do que frente aos outros dois vírus, embora se observe apenas uma pequena diferença de valores obtidos para BVDV e CAV-2 (Tabela 1). O BVDV possui uma diferença estrutural em sua morfologia com relação aos outros dois vírus que é a presença de um envelope lipídico envolvendo o nucleocapsídeo (BUCKWOLD et al., 2003). Se a própolis tivesse apresentado atividade antiviral apenas contra o BVDV talvez fosse possível inferir que este efeito estivesse relacionado com a presença do envelope, como já tem sido descrito em outros trabalhos (SCHNITZLER et al, 2009, SCHNITZLER et al., 2010). Mas este não foi o caso, uma vez que ela apresentou atividade considerável frente a um vírus envelopado (BVDV) e outro não envelopado (CAV-2) no pré-tratamento.

Estudos realizados com a própolis em laboratórios não relacionados têm produzido resultados diversos, inclusive opostos. Extratos aquosos e etanólicos de própolis demonstraram boa atividade antiviral sobre herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (HULEIHEL & ISANU, 2002, SCHNITZLER et al., 2009) e tipo 2 (HSV-2) SCHNITZLER et al (2010) em diferentes oportunidades. HULEIHEL & ISANU (2002) obtiveram uma proteção quase total frente ao efeito citopático do HSV-1 em células Vero com a adição de extrato aquoso de própolis às células 2 horas antes ou no momento da inoculação viral. Por outro lado, SCHNITZLER et al (2009) e SCHNITZLER et al. (2010), demonstraram que extratos etanólicos e aquosos de própolis causavam uma redução >90% na formação de placas *in vitro* pelo HSV-1 e HSV-2,

respectivamente. Entretanto, nestes dois últimos trabalhos citados a atividade antiviral foi observada quando os vírus testados foram tratados com o extrato antes de serem colocados em contato com as células, mas não com o pré-tratamento das células (SCHNITZLER et al., 2009, SCHNITZLER et al., 2010).

A própolis e seus derivados já foram testados também frente ao HIV apresentando resultados promissores (ITO et al., 2001, GEKKER et al. 2005). Extratos etanólicos de própolis de diferentes regiões geográficas inibiram a expressão viral do HIV em células da micróglia e linfócitos T CD4+ com aumentada eficiência de acordo com a dose ministrada (GEKKER et al., 2005). No caso do trabalho citado, através de ensaios que quantificam a fusão do vírus à membrana celular foi possível determinar que o mecanismo antiviral da própolis envolveu a inibição da entrada viral (GEKKER et al., 2005).

Existem muitas variáveis em estudos de atividade antiviral que podem levar a resultados diferentes e até discordantes. No caso específico da própolis já tem sido considerado que pela composição química variável, a comparação entre resultados pode ser tão complexa como a comparação entre extratos de plantas de diferentes famílias botânicas (BANKOVA, 1995). No entanto existe um ponto comum entre os resultados obtidos por diferentes pesquisadores frente ao HSV-1 e 2, o HIV, e os resultados aqui apresentados. Em todos os casos os extratos de própolis mostraram sua melhor atividade em algum passo anterior à entrada do vírus na célula (Tabela 1), (HULEIHEL & ISANU, 2002, GEKKER et al., 2005, SCHNITZLER et al., 2009, SCHNITZLER et al., 2010).

É importante salientar que em todos os experimentos citados acima apenas um vírus estava sendo testado, seja o HSV ou HIV (HULEIHEL & ISANU, 2002, GEKKER et al., 2005, SCHNITZLER et al., 2009, SCHNITZLER et al., 2010); enquanto no trabalho aqui descrito foram testados diferentes vírus no mesmo experimento (Tabela 1). E o fato importante já

mencionado é que a própolis teve boa atuação sobre um vírus envelopado e outro não, e ainda, não apresentou atividade sobre um terceiro vírus não-envelopado no pré-tratamento (Tabela 1).

Embora no presente trabalho não foi realizado o tratamento do vírus com a própolis antes da inoculação em células, o que limita as inferências sobre o momento de atuação do extrato; existem algumas coincidências com outros trabalhos realizados que merecem atenção. HULEIHEL & ISANU (2002) sugerem que a interação da própolis com a membrana celular bloqueou a penetração do HSV ou causou alteração interna na célula hospedeira impedindo passos iniciais da replicação do vírus. GEKKER et al. (2005), por sua vez, observou que a própolis suprimiu a fusão celular em mais de 50%, sugerindo uma inibição da entrada do vírus na célula. Então, a inibição da replicação de dois vírus estruturalmente diferentes pela própolis em células tratadas com a mesma antes da inoculação viral, reforça a idéia de uma atuação desta sobre a célula.

Seguindo a avaliação geral dos resultados obtidos, pôde-se observar uma melhor atuação do extrato obtido no próprio laboratório em comparação ao extrato obtido comercialmente (Tabela 1). Divergências na atividade antimicrobiana de extratos de própolis de diferentes procedências têm sido amplamente relatadas (HULEIHEL & ISANU, 2002, GEKKER et al., 2005, SCHINTZLER et al., 2009, SCHNITZLER et al., 2010) e em muitos casos têm sido atribuída à diferença na composição química principalmente no que se refere ao conteúdo de flavonóides (SCHINTZLER et al., 2009, SCHNITZLER et al., 2010). A pequena diferença na altura dos picos referentes aos flavonóides avaliados na análise cromatográfica das amostras (Tabela 1) aliada a diferenças nos conteúdos de componentes não avaliados, talvez pudesse explicar estes resultados. Entretanto, seriam necessárias uma análise mais detalhada das amostras e a realização de estudos com os componentes isolados para podermos elucidar estas diferenças.

A indicação do extrato de própolis como um medicamento contra os vírus de cães e gatos estudados ainda não é possível apenas com os resultados aqui demonstrados. Todavia, a eficaz atividade antiviral deste extrato sobre o CAV-2 (Tabela 1) evidencia um potencial que deveria ser levado em consideração. Principalmente pelo fato de que não existem medicamentos disponíveis contra este vírus (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007) e também de que a busca por terapias para doenças de animais de estimação têm aumentado à medida que se observa uma mudança de atitude de proprietários cada vez mais dispostos a investir na saúde de seus animais.

Por outro lado, a atuação dos extratos sobre o BVDV sugere uma possível atividade sobre o HCV, uma vez que o BVDV tem sido estudado como modelo para HCV (BUCKWOLD et al., 2003). O tratamento atual do HCV é baseado em uma associação de ribavirina e interferon (BUCKWOLD et al., 2003, BHATACARYYA et al., 2004) que tem funcionado satisfatoriamente, mas apresenta muitos efeitos colaterais (BHATACARYYA et al., 2004). O interferon e a ribavirina inibem a replicação viral após a entrada do vírus na célula (BUCKWOLD et al., 2003, BHATACARYYA et al., 2004). Aparentemente, a própolis inibe algum passo anterior à entrada do vírus na célula (Tabela 1). A utilização de fármacos antivirais que atuam em diferentes momentos da replicação viral é um conceito que tem apresentado bons resultados contra o HIV e, mesmo contra o HCV, uma vez que o tratamento muitas vezes se baseia na combinação de ribavirina e interferon (BUCKWOLD et al., 2003). Levando-se em consideração estes argumentos, justificam-se estudos posteriores para examinar a atuação da própolis em conjunto com os fármacos atualmente utilizados contra o HCV.

4 CONCLUSÃO

Embora a alta toxicidade possa indicar uma outra atividade da própolis, como antitumoral, por exemplo; os resultados indicam também uma ação antiviral que deve ser melhor explorada para estes e para outros vírus de interesse da Medicina Humana e Veterinária.

5 REFERÊNCIAS

- AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal Nat Prod**, v.55, n.12, dec, p.1732-40. 1992.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**,v.50,n.3-4,Mar-Apr,p.167-72.1995.
- BANSKOTA, A.H.et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v.8,n.1,Jan,p.16-23.2001.
- BHATTACHARYYA, R. et al. *Psyllanthus amarus* clone with significant activity against bovine diarrhoea virus - a surrogate model of Hepatitis C virus. **Current Science**, v.84, n.4, p.529-533. 2004.
- BUCKWOLD, V. E. et al. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of Hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. **Antiviral research**, v.60, n.1, sep, p.1-15. 2003.
- BÚFALO, M.C. et al. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.6, n.4,Dec, p.483-7.2007
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol.**,v.36, n.4,Apr, p.347-63.1998..
- BUONAVOGLIA, C;MARTELLA, V. Canine respiratory viruses. **Vet. Res**, v.38, p.355–373.2007..

DEZENGRINI, R. **Soroprevalência de Infecções víricas em cães de Santa Maria, RS; e seleção e caracterização de linhagens celulares resistentes ao vírus da diarreia viral bovina.** 1996.63f Dissertação(Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1996.

DRAGO, L. et al. In vitro activity of a novel própolis formulation (Actichelated própolis). **J Appl Microbiol**, v.103, n.5, Nov, p.1914-21. 2007.

FLORES, EF, WEIBLEN, R, VOGEL, FSF, ROEHE, PM, ALFIERI, AA, PITUCO, EM. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq Vet Bras**, v.25, n.3, p.125-134. 2005.

GEKKER G. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **J Ethnopharmacol**, v.102, n.2, Jul 19, p.158-62. 2005.

HULEIHEL, M; ISANU, V. Anti-herpes simplex vírus effect of an aqueous extract of própolis. **Isr Med Assoc J**, v.4, n.11, Nov, p.923-7. 2002.

ITO, J. et al. Anti-AIDS agents. 48.(1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **J Nat Prod**. v.64,n.10,Oct, p.1278-81.2001.

KUJUMGIEV et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J Ethnopharmacol**, v.64, n.3, Mar, p.235-40, 1999.

LEE, S.-J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* l.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* l.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry** v.91, p.131-137. 2005.

NETO, F.R.A et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova**, v.25, n.2,p.321-26.2002.

PARK, H. J. et al. Antiviral activity of the marine alga *Symphyclocladia latiuscula* against herpes simplex virus (HSV-1) *in vitro* and its therapeutic efficacy against HSV-1 infection in mice. **Biol Pharm Bull**, v.28, n.12, dec, p.2258-62. 2005.

PILAU, M. **Atividade de óleos essenciais de condimentos frente a Herpesvírus, Flavivírus, Paramyxovírus e Reovírus** 2010.115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,2010.

RADFORD, AD.et al. Feline Calicivirus. **Vet Res**, v.38, n.2, Feb 13, p.319-35. 2007.

SANTOS, F.A. et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J Ethnopharmacol**;v.80, n.1, Apr, p.1-7.2002.

SANTOS, V.R. et al. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. **Phytother Res**,v.19, n.7,Jul, p.652-4. 2005.

SCHNITZLER, P. et al. Antiviral Activity and Mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytother Res**, v.24, n.1,Jan, p.20-8.2009.

SCHNITZLER, P. et al. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v.17, n.2, Aug, p.132-8. 2010.

SILICI S; KUTLUCA S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **J Ethnopharmacol**, V.99, n.1, May, p.69-73, 2005.

SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v.73,n.1-2,Nov, p.243-9. 2000.

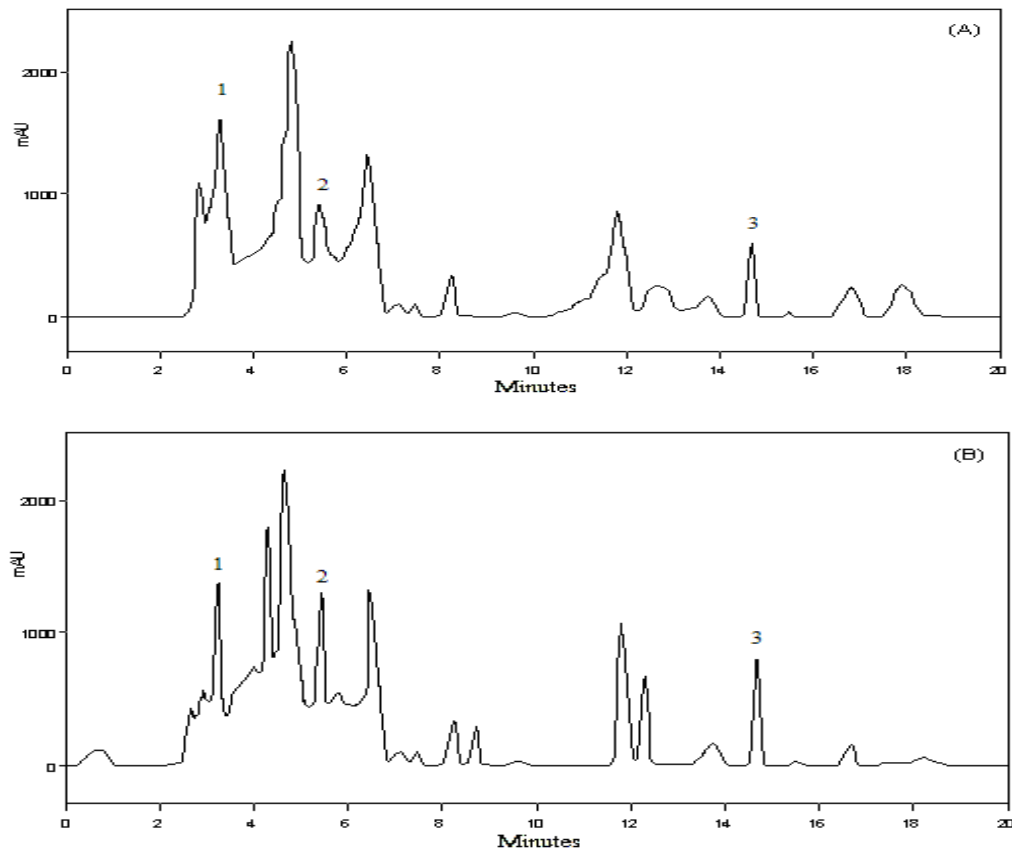
VYNOGRAD, N. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v.7,n.1,Mar,p.1-6.2000..

TABELA 1- Citotoxicidade e atividade antiviral do extrato de própolis frente ao BVDV, CAV-2 e FCV.

		Pré tratamento			Pós tratamento		Pré e Pós tratamento	
Extrato	Vírus	CC ₅₀	IC ₅₀	I.T	IC ₅₀	I.T	IC ₅₀	I.T
Extraído	BVDV	293	21,7	13	111,7	2,6	-	-
	CAV	227	24,25	9,45	98	2,3	100	2,3
	FCV	251	neg	neg	79,3	3,16	47	5,34
Comercial	BVDV	343	54,37	6,3	85,5	4	-	-
	CAV-	330	55,18	6	67,5	4,8	146	2,26
	FCV	295	neg	neg	80	3,68	68	3,7

* valores expressos em µg/ml ,neg: valores negativos; CC₅₀ =concentração que causou destruição em 50% das células ; IC₅₀ =concentração que inibiu 50% do efeito citopático; Índice de terapêuticIT= CC₅₀/IC₅₀

FIGURA 1- Perfil por CLAE de amostra extraída (A) e obtida comercialmente (B) de própolis. Ácido gálico (1), rutina (2) e quercetina (3).



5 CONCLUSÕES

- Ambos os extratos apresentaram uma citotoxicidade inicial muito alta.
- Os extratos de própolis testados neste trabalho apresentaram atividade antiviral frente ao BVDV, CAV-2 e FCV.
- Os extratos apresentaram melhor atividade frente ao CAV-2 e BVDV do que frente ao FCV.
- A atividade antiviral frente ao BVDV e CAV-2 foi observada quando os extratos foram adicionados à célula anteriormente à inoculação dos vírus.
- O extrato obtido no laboratório apresentou melhor atividade do que o extrato comercial.
- Os resultados obtidos sugerem um potencial de atividade antiviral da própolis fundamentando a continuação das pesquisas sobre a atuação deste produto sobre estes vírus e outros que ainda não foram estudados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFIERI, A. A. et al. Reoviridae. In: Flores, E. (Org). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: ed.UFSM, 2007.p.397-412.

AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal Nat Prod**, v.55, n.12, dec, p.1732-40. 1992.

BANSKOTA, A.H.et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v.8,n.1,Jan,p.16-23.2001.

BANSKOTA, A.H.et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, v.80, n.1, Apr, p.67-73.2002.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**,v.50,n.3-4,Mar-Apr,p.167-72.1995.

BASS, E.P.et al. Evaluation of a canine adenovirus type 2 strain as a replacement for infectious canine hepatitis vaccine. **J Am Vet Med Assoc**, v.177,n.3,p.234-42.1980

BHATTACHARYYA, R. et al. *Psyllanthus amarus* clone with significant activity against bovine diarrhoea virus - a surrogate model of Hepatitis C virus. **Current Science**, v.84, n.4, p.529-533. 2004.

BIDAWID S, MALIK N, ADEGBUNRIN O, SATTAR SA, FARBER JM. A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivírus, a surrogate for Norwalk vírus. **J Virol Methods**., v.107, n.2, p.163-167, 2003.

BUCKWOLD, V. E. et al. Bovine viral diarrhoea virus as a surrogate model of Hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. **Antiviral research**, v.60, n.1, sep, p.1-15. 2003.

BÚFALO, MC et al. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *J Appl Microbiol*, v.107, n.5, Apr 21, p.1669-80. 2009.

BÚFALO, M.C. et al. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.6, n.4, Dec, p.483-7. 2007.

BUONAVOGLIA, C et al. Canine Adenoviruses and Herpesvirus. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.38, n.4, Jul, p.799-814. 2008.

BUONAVOGLIA, C; MARTELLA, V. Canine respiratory viruses. **Vet. Res**, v.38, p.355–373. 2007.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol.**, v.36, n.4, Apr, p.347-63. 1998.

CANN, A. **Principles of molecular virology**; 4^{ed}; 2005. p.2-15.

CARDOSO, R.L. et al. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Vet Microbiol**, v.142, n.3-4, Oct 20, p.432-4. 2010.

CLARKE, IN; LAMBDEN PR. The molecular biology of human caliciviruses. **Novartis Found Symp**, v.238, p.180-91. 2001.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v.1, n.1, jan, p.13-25. 2002.

DE CLERCQ, E. Antivirals and antiviral strategies. **Nat Rev Microbiol**, v.2, n.9, sep, p.704-20. 2004b

DEZENGRINI, R. **Soroprevalência de Infecções víricas em cães de Santa Maria, RS; e seleção e caracterização de linhagens celulares resistentes ao vírus da diarreia viral bovina.**1996.63f Dissertação(Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1996.

DRAGO, L. et al. In vitro activity of a novel própolis formulation (Actichelated própolis). **J Appl Microbiol**, v.103, n.5, Nov, p.1914-21. 2007.

FISCHER, G.et al. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. **Vet Immunol Immunopathol**, v.116, n.1-2,Mar, p.79-84.2007.

FLORES, E. Estrutura e composição dos vírus. In: Flores, E. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. p.19-36.

FLORES, EF, WEIBLEN, R, VOGEL, FSF, ROEHE, PM, ALFIERI, AA, PITUCO, EM. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq Vet Bras**, v.25, n.3, p.125-134. 2005.

GASKELL, R.et al. Feline herpesvirus. **Vet Res**;v.38,n.2, p.337-54.2007.

GEKKER G. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **J Ethnopharmacol**, v.102, n.2, Jul 19, p.158-62. 2005.

HU, R.L.et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Vet Res Commun**;v.25,n.1, p.77-84.2001.

HULEIHEL, M; ISANU, V. Anti-herpes simplex vírus effect of an aqueous extract of própolis. **Isr Med Assoc J**, v.4, n.11, Nov, p.923-7. 2002.

HUTSON AM, ATMAR RL, ESTES MK. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. **Trends Microbiol.**, v.12, n.6, p.279-287, 2004.

ITO, J. et al. Anti-AIDS agents. 48.(1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **J Nat Prod.** v.64,n.10,Oct, p.1278-81.2001.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal Appl Microbiol**, v.95, n.3, p.412-27. 2003.

KREUTZ, LC et al. Isolation of *Prothoteca zoppii* from a case of bovine mastitis in Brazil. **Mycopathologia**, v.142, n.3, p.135-7.1998.

KUJUMGIEV et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J Ethnopharmacol**, v.64, n.3, Mar, p.235-40, 1999.

KUYUMCU-MARTINEZ M, BELLIOU G, SOSNOVTSEV SV, CHANG KO, GREEN KY, LLOYD RE. Calicivirus 3C-like proteinase inhibits cellular translation by cleavage of poly(A)-binding protein. **J Virol.**, v.78, n.15, p.8172-8182, 2004.

LAURITZEN, C.G. et al. The evolving role of springs in craniofacial surgery: the first 100 clinical cases. **Plast Reconstr Surg**, v.121, n.2, p.545-54.2008.

LI, F. et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorg Med Chem**, v.16,n.10,May, p.5434-40.2008.

LIANG, T.J, REHERMAN B, SEEFF LB, HOOFNAGLE JH. Pathogenesis, natural history, treatment, & prevention of hepatitis C. **Ann Intern Med.**, v.132, n.4, p.296-305, 2000.

LINDENBACH, BD, RICE, CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In:KNIFE, DM, HOWLEY, PM. **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 2v.

MCCANN KB, LEE A, WAN J, ROGINSKI H, COVENTRY MJ. The effect of bovine lactoferrin & lactoferricin B on the ability of feline calicivirus (a norovirus surrogate) & poliovirus to infect cell cultures. **J Appl Microbiol.**, v.95, n.5, p.1026-1033, 2003.

MERESTA, L.; MERESTA, T. Sensitivity of bovine mastitis bacteria to propolis in vitro. **Medycyna-weterynaryjna**, v.41, p.489-492, 1985.

MORAES, M.P,COSTA, P.R.S. Adenovirus In: Flores, E. (Org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007. p.422.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol Methods**, v.65, n.1-2, decembre 16, p.55-63. 1983.

MURPHY, FA, GIBBS, EPJ, HORZINEK, MC, STUDDERT, MJ. **Veterinary virology**. San Diego: Academic Press, 1999. P 629.

NETO, F.R.A et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova**, v.25, n.2,p.321-26.2002.

PARK, H. J. et al. Antiviral activity of the marine alga *Symphyclocladia latiuscula* against herpes simplex virus (HSV-1) *in vitro* and its therapeutic efficacy against HSV-1 infection in mice. **Biol Pharm Bull**, v.28, n.12, dec, p.2258-62. 2005.

QUINTERO-MORA, M.L.et al Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. **Rev Iberoam Micol**,v.25, n.1,Mar, p.22-6.2008.

RADFORD, AD.et al. Feline Calicivirus. **Vet Res**, v.38, n.2, Feb 13, p.319-35. 2007.

RODRIGUEZ, L. et al.Rhabdoviridae. In: Flores, E. (Org). **Virologia Veterinária**. Santa Maria, 2007.p.689-720.

ROMERO, M. R. et al. Antiviral effect of artemisinin from *Artemisia annua* against a model member of the *flaviviridae* family, the bovine viral diarrhoea virus (BVDV). **Planta Med**, v.72, n.13, oct, p.1169-74. 2006.

ROY, N. et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. **Colloids Surf B Biointerfaces**,v.76,n.1,Dec 16,p.317-25.2010.

RUSSO, A. et al. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73 Suppl 1, Nov, p.21-9.2002.

SANTOS, F.A. et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J Ethnopharmacol**; v.80, n.1, Apr, p.1-7.2002.

SANTOS, V.R. et al. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. **Phytother Res**, v.19, n.7, Jul, p.652-4. 2005.

SCHNITZLER, P. et al. Antiviral Activity and Mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytother Res**, v.24, n.1, Jan, p.20-8.2009.

SCHNITZLER, P. et al. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v.17, n.2, Aug, p.132-8. 2010.

SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v.73, n.1-2, Nov, p.243-9. 2000.

SONG, Y. S. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. **J Ethnopharmacol**, v.82, n.2-3, Oct, p.89-95.2002.

TEIXEIRA, E.W. et al. Seasonal variation, chemical composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2008.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.3, n.2, Jun, p.249-54.2006.

VYNOGRAD, N. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v.7, n.1, Mar, p.1-6.2000.

YANAGIDA, K. et al. Inhibition of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by mizoribine: synergistic effect of combination with interferon-alpha. **Antiviral Research**, v.64, n.3, Dec, p.195-201. 2004.

